

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 24520091152926

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**TFF2 与转录因子 Sp3 相互作用及  
在胃癌细胞中的功能学研究**

**Function of the interaction between TFF2  
and transcription factor Sp3 in gastric  
cancer cells**

蔡艺玲

指导教师姓名: 施华秀 副教授

专 业 名 称: 内 科 学

论文提交日期: 2012 年 04 月

论文答辩时间: 2012 年 05 月

学位授予日期: 2012 年 07 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 月

TFP2 与转录因子 Sp3 相互作用及在胃癌细胞中的功能学研究

蔡艺玲

指导教师

施华秀

副教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘要

**目的：**验证三叶因子 2（TFF2）与转录因子 Sp3 的结合关系，初步研究 TFF2 及 Sp3 相互作用在胃癌细胞中的功能，进而探索二者的作用机制，从而为胃癌的早期诊断及分子靶向治疗提供理论依据和新的方向。

**方法：**本研究在前期的酵母双杂交实验基础上，筛选 TFF2 候选结合蛋白 Sp3，使用免疫荧光共聚焦及免疫共沉淀方法，明确 TFF2 及 Sp3 的共定位及结合关系；利用 siRNA 干扰及过表达技术，构建稳定干扰 Sp3 和（或）过表达 TFF2 的 4 株 BGC-823 胃癌细胞株，通过 Brdu、细胞流式、Transwell 小室等技术，检测 TFF2 及 Sp3 对胃癌细胞增殖、凋亡、周期、迁移及侵袭能力的影响；使用蛋白芯片技术检测 TFF2 与 Sp3 对凋亡信号通路蛋白的影响，用 Western blot 进一步明确相关信号通路蛋白水平的变化情况，深入研究 TFF2 与 Sp3 在胃癌细胞凋亡和细胞周期的作用机制。

**结果：**实验前期，我们通过酵母双杂交系统，得到 TFF2 的候选结合蛋白转录因子 Sp3，经免疫荧光共聚焦及免疫共沉淀证实 TFF2 与 Sp3 存在共定位及结合关系。体外细胞功能实验显示，Sp3 增强胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移及侵袭能力，而对细胞周期具有促进作用；TFF2 则抑制胃癌细胞的增殖、迁移能力，将细胞周期阻滞于 G1 期，促进细胞凋亡及侵袭能力；而过在二者共同存在时，胃癌上述功能亦有明显改变。信号通路蛋白电泳分析显示，TFF2 与 Sp3 对 Bcl<sub>2</sub> 家族蛋白和 NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白具有显著的影响。

**结论：**转录因子 Sp3 是 TFF2 的结合蛋白，TFF2 与 Sp3 可影响胃癌细胞的增殖、凋亡、周期、迁移及侵袭等功能，且二者存在相互作用，并可影响胃癌的发生发展。

**关键词：**三叶因子 2 转录因子 Sp3 胃癌

## Abstract

**Objective:** To verify the binding relationship of trefoil factor 2 (TFF2) and transcription factor Sp3, and study preliminary on the function of TFF2 and Sp3 in gastric cancer cells as well as the role of two proteins on development of gastric cancer. Furthermore, to explore the mechanism of two proteins on apoptosis of gastric cancer cells, which provide a theoretical basis and a new direction for the early diagnosis of gastric cancer and molecular targeted therapy.

**Methods:** In this study, we selected transcription factor Sp3 as the candidate binding protein of TFF2 based on the preliminary yeast two-hybrid experiment. Immunofluorescence confocal and co-immunoprecipitation were employed to verify the co-localization and combination of TFF2 and Sp3. Small molecule RNA (siRNA) and over-expression were used to build stable interfered Sp3 and-or over-expressed TFF2 of BGC-823 gastric cancer cell lines. Then we analyzed the functions of TFF2 and Sp3 in proliferation, apoptosis, cell cycle, migration and invasion of gastric cancer cells applying Brdu-kit, cell streaming and Transwell. Furthermore, protein chips were employed to detect the function of TFF2 and Sp3 in cell apoptosis signaling pathway, Western blot was used to verify the proteins of signaling pathways to study of the role of TFF2 and Sp3 in apoptosis of gastric cancer cells.

**Results:** In preliminary experiments, we adopted transcription Sp3 as one candidate binding protein of TFF2 by yeast two-hybrid assay. And the co-localization and combination of TFF2 and Sp3 was confirmed by immunofluorescence confocal and co-immunoprecipitation. Cell function experiments in vitro showed that the interfered Sp3 inhibited gastric cancer cell proliferation, apoptosis, migration and invasion, but promoted cell cycle in gastric cancer cells. While over-expressed TFF2 inhibited cell proliferation, migration, and blocked cell cycle in G1 phase, but promoted cell apoptosis and invasion. And the effect changed significantly in the case of TFF2

over-expressed and Sp3 interfered. Analysis of signaling pathway proteins showed that apoptosis and cell cycle-related proteins such as Bcl<sub>2</sub> and NF  $\kappa$  B significantly changed in different level of TFF2 and Sp3.

**Conclusion:** Transcription factor Sp3 is one of binding protein of TFF2. TFF2 and Sp3 can both affect cell proliferation, apoptosis, cell cycle, migration and invasion in gastric cancer cells. And the interaction between two proteins has a certain impact on the development of gastric cancer.

**Keywords:** Sp3; TFF2; gastric cancer

## 目 录

摘 要	I
ABSTRACT	II
TABLE OF CONTENTS	VIII
第一章 绪论	1
第二章 TFF2 的结合蛋白筛选及验证	4
2.1 实验材料与主要试剂配方	4
2.1.1 实验材料	4
2.1.2 主要购置试剂	4
2.1.3 主要试剂配方	6
2.1.4 主要仪器	6
2.2 实验方法	7
2.2.1 酵母双杂交技术	7
2.2.2 PCR 反应扩增目的片段	9
2.2.3 感受态细菌制备与转化	9
2.2.4 质粒的抽提与纯化	10
2.2.5 测序鉴定	11
2.2.6 细胞培养及脂质体转染	11
2.2.7 细胞免疫荧光技术	12
2.2.8 细胞蛋白提取及蛋白定量	12
2.2.9 Western blot	13
2.2.10 免疫共沉淀 (Co-IP)	15
2.3 实验结果	16
2.3.1 酵母双杂交技术筛选出 TFF2 结合蛋白	16
2.3.2 TFF2 与 Sp3 在 GES-1 细胞内共定位	18
2.3.3 外源性 TFF2 重组质粒构建及蛋白验证	19



2.3.4 TFF2 与 Sp3 在 GES-1 细胞及 HEK-293 细胞内相结合 .....	20
2.4. 小结 .....	20
<b>第三章 TFF2 与 SP3 在胃癌细胞中的功能 .....</b>	<b>22</b>
3.1 实验材料与主要试剂配方 .....	22
3.1.1 实验材料 .....	22
3.1.2 主要购置试剂 .....	23
3.1.3 主要仪器 .....	24
3.2 实验方法 .....	25
3.2.1 逆转录半定量 PCR .....	25
3.2.2 干扰质粒构建 .....	27
3.2.3 BGC-823 干扰稳转细胞株的筛选 .....	30
3.2.4 BGC-823 过表达稳转细胞株的筛选 .....	31
3.2.5 Brdu 试剂盒检测细胞增殖能力 .....	32
3.2.6 细胞迁移及侵袭能力检测 .....	33
3.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 .....	33
3.2.8 流式细胞术检测细胞周期 .....	35
3.2.9 数据分析和统计学处理 .....	36
3.3 实验结果 .....	36
3.3.1 TFF2 与 Sp3 在各株细胞系中的 mRNA 水平 .....	36
3.3.2 干扰及过表达稳转细胞株的建立及验证 .....	36
3.3.3 TFF2 与 Sp3 及二者相互作用对胃癌细胞增殖具有明显的作用 .....	37
3.3.4 TFF2 与 Sp3 明显改变胃癌细胞迁移能力 .....	38
3.3.5 TFF2 与 Sp3 对胃癌细胞侵袭能力具有显著影响 .....	39
3.3.6 TFF2 与 Sp3 明显改变胃癌细胞的凋亡能力 .....	40
3.3.7 TFF2 与 Sp3 对胃癌细胞的周期分布有明显的作用 .....	40
3.4 小结 .....	41
<b>第四章 TFF2 与 SP3 在胃癌细胞凋亡及周期中的作用机制 .....</b>	<b>43</b>
4.1 实验材料与主要试剂配方 .....	43
4.1.1 实验材料 .....	43

4.1.2 主要购置试剂·····	43
<b>4.2 实验方法·····</b>	<b>44</b>
4.2.1 细胞培养 ·····	44
4.2.2 蛋白芯片 ·····	44
4.2.3 数据分析和统计学处理·····	45
<b>4.3 实验结果·····</b>	<b>45</b>
4.3.1 TFF2 和 Sp3 相关的凋亡通路蛋白 ·····	45
4.3.2 TFF2 和 Sp3 相关的凋亡及细胞周期信号通路 ·····	46
<b>4.4 小结·····</b>	<b>48</b>
<b>第五章 总结与展望·····</b>	<b>49</b>
<b>参考文献： ·····</b>	<b>51</b>
<b>综述 ·····</b>	<b>53</b>
<b>致 谢 ·····</b>	<b>61</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>VII</b>
<b>Part 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Part 2 TFF2 and its candidate binding protein Sp3</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Materials and Reagents formula</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 Materials .....	4
2.1.2 Mainly reagents .....	4
2.1.3 Reagents formula .....	6
2.1.4 Main instrument .....	6
<b>2.2 Methods</b> .....	<b>7</b>
2.2.1 Yeast two-hybrid system .....	7
2.2.2 PCR amplify fragments .....	9
2.2.3 Preparation and transformation of competent bacteria .....	9
2.2.4 Extraction and purification of plasmids .....	10
2.2.5 DNA sequencing .....	11
2.2.6 Cell culture and lipofection .....	11
2.2.7 Immunofluorescence .....	12
2.2.8 Cell protein extraction and protein quantification .....	12
2.2.9 Western blot .....	13
2.2.10 Co-immunoprecipitation (Co-IP) .....	15
<b>2.3 Experimental results</b> .....	<b>16</b>
2.3.1 TFF2 candidate binding proteins selected yeast two-hybrid .....	16
2.3.2 Co-localization of TFF2 and Sp3 in the GES-1 cells .....	18
2.3.3 Exogenous TFF2 recombinant plasmid and protein validation .....	19
2.3.4 TFF2 and Sp3 combined in GES-1 cells and HEK-293 cells .....	20
<b>2.4. Conclusion</b> .....	<b>20</b>

<b>Part 3 The function of TFF2 and Sp3 in gastric cancer cells</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Materials and Reagent formula</b>	<b>22</b>
3.1.1 Materials	22
3.1.2 Mainly reagents	23
3.1.3 Main instrument	24
<b>3.2 Methods</b>	<b>25</b>
3.2.1 sqRT-PCR	25
3.2.2 Construction of interference plasmid	27
3.2.3 Selection of stable siRNA in BGC-823 cell	30
3.2.4 Selection of stable over-expression of plasmid in BGC-823 cell	31
3.2.5 Detection of cell proliferation capacity by Brdu kit	32
3.2.6 Detection of cell migration and invasion ability	33
3.2.7 Detection of cell apoptosis by flow cytometry	33
3.2.8 Detection of cell cycle by flow cytometry	35
3.2.9 Data analysis and statistical processing	36
<b>3.3 Results</b>	<b>36</b>
3.3.1 Expression level of TFF2 and Sp3 mRNA in different cell lines	36
3.3.2 Verifying the effect of interference and overexpression in the four cell lines	36
3.3.3 Interaction of TFF2 and Sp3 acts a significant role in gastric cancer cells	37
3.3.4 TFF2 and Sp3 significantly change the cell migration in gastric cancer cells	38
3.3.5 TFF2 and Sp3 significantly affect the cell invasion in gastric cancer cells	39
3.3.6 TFF2 and Sp3 significantly change the capacity of cell apoptosis in gastric cancer cells	40
3.3.7 TFF2 and Sp3 significantly effect cell cycle gnificantly in gastric cancer cells	40

<b>3.4 Conclusion</b>	<b>41</b>
<b>Part 4 Mechanism of TFF2 and SP3 act in apoptosis and cell cycle of the gastric cancer cells</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Materials and reagent formula</b>	<b>43</b>
4.1.1 Materials	43
4.1.2 Mainly reagents	43
<b>4.2 Methods</b>	<b>44</b>
4.2.1 Cell culture	44
4.2.2 Protein Chip	44
4.2.3 Data analysis and Statistical processing	45
<b>4.3 Results</b>	<b>45</b>
4.3.1 TFF2 and Sp3-related apoptotic pathway proteins	45
4.3.2 TFF2 and Sp3-related apoptosis and cell cycle signaling pathway	46
<b>4.4 Conclusion</b>	<b>48</b>
<b>Part 5 Conclusion and Prospect</b>	<b>49</b>
<b>Reference</b>	<b>51</b>
<b>Review</b>	<b>53</b>
<b>Acknowledgements</b>	<b>61</b>

## 第一章 绪论

胃癌是人体常见的恶性肿瘤之一，全球胃癌发生率居所有恶性肿瘤第四位，在癌症病死率中排列第二。胃癌的发生发展是一个多步骤、多因素进行性发展的过程，涉及多种癌基因与抑癌基因的相互调控，一直是医学研究的热点。三叶因子 2（trefoil factor 2, TFF2）是近年来发现的一种胃肠道黏膜分泌蛋白，参与胃肠黏膜的保护，相关研究表明，胃癌细胞中 TFF2 表达明显下调，且 TFF2 的减少与胃癌的发生发展以及恶性程度有关。寻找 TFF2 的结合蛋白，并验证它们之间的相互作用，可以更好地探讨 TFF2 的生物学功能，这已成为胃癌发生机制研究的新方向。本课题将在前期酵母双杂交实验的基础上，进一步验证 TFF2 及其结合蛋白相互作用对胃癌发生发展的影响。

三叶因子 2（TFF2），原名解痉多肽（Spasmolytic polypeptide, SP）。最早由 Jorgensen 等<sup>[1]</sup>于 1982 年在猪胰腺发现。三叶因子家族（Trefoil factor family, TFFs）是一类大小为 7-12kDa，含一个或多个特殊三叶结构域的黏液相关肽家族，主要表达于哺乳动物胃肠黏膜的粘液上皮细胞，并分泌至胃肠道中，在病理状态下，可出现表达上调或沉默现象。其基因与三叶因子家族的另两个蛋白 TFF1 和 TFF3 共同位于染色体 21q22.3 位点，编码共同的保守序列，分别为 N 端信号肽、三叶结构域（P 结构域）及 C 端半胱氨酸富集区<sup>[2]</sup>。P 结构域是三叶因子家族成员的特征性结构域，由 38-39 个氨基酸残基组成，其共有序列为：C-X6-7-R-X2-C-G-X-P-X6-C-X4-C-C-F-X7-P-W-C-F<sup>[1]</sup>，其中 C 代表半胱氨酸（Cys）残基，X 代表任意氨基酸残基，序列中的 6 个半胱氨酸残基以 1-5, 2-4, 3-6 方式配对形成分子内二硫键（P-W-C-F），通过分子内二硫键，TFFs 可形成单体、同源二聚体和异源二聚体三种形式。三叶因子家族正是因为具有这种“三叶草”形结构，使其具有抗酸消化、耐热及抗蛋白酶水解的特性，因此，三叶因子家族能在消化道复杂的环境中发挥其生物功能<sup>[3]</sup>。

TFF2 在正常组织中的特异性分布，与其功能密切相关。我们和其他学者的工作已证实，TFF2 对胃肠道上皮具有明确的保护作用，并能促进损伤黏膜的愈合。这一作用可能通过以下几种机制：稳定黏液凝胶，刺激黏膜细胞增生，加快上皮细胞修复，降低胃酸的分泌，以及抑制各种刺激引起的炎症反应<sup>[4]</sup>。

而在肿瘤细胞中, TFF2 的表达明显下降, 并随胃癌细胞的恶性程度增加而降低, 可能是由于 TFF2 可作为一种胃癌的抑制性蛋白, 在胃癌发生发展中表达减弱, 对胃癌的抑制作用降低, 同时一些促肿瘤浸润转移因子的表达增加, 从而促进肿瘤的发生发展<sup>[5]</sup>。

这些证据表明, TFF2 与胃肠道肿瘤的生成、发展具有密切的关系。虽然大量研究都提示 TFF2 与胃癌关系密切, 但是目前对 TFF2 在胃癌发生、发展中的具体分子机制仍不明确。我们前期的实验研究, 旨在寻找 TFF2 在胃癌中相互作用蛋白, 以期探讨其在胃癌中作用机制。我们前期实验通过 ProQuest™ 酵母双杂交系统筛选胃癌文库, 获得的转录因子 Sp3 可能是 TFF2 相互作用蛋白。

转录因子 Sp3 是转录因子 Sp/KLF 蛋白家族的成员之一, 广泛颁布于哺乳动物细胞中的一种核蛋白, 含有 3 个 C-端锌指结构的 DNA 结合域, 以及一些激活域, 并可通过结合目的基因的 GC-和 GT-盒调控元件来调控转录<sup>[6]</sup>。Sp3 具有激活或遏制基因的启动子, 因此对大多数基因的转录有双重调控作用。另外, Sp3 对细胞分化, 细胞周期及肿瘤形成, 均具有双重调控作用<sup>[7]</sup>。在肿瘤细胞中, Sp3 表达水平高于正常细胞。

在人类基因组上至少有 12,000 个 Sp3 蛋白的结合位点, 且多数与细胞突蛋白相关<sup>[8]</sup>。生长抑制途径中, 转化生化因子  $\beta$  (TGF  $\beta$ )/TGF  $\beta$  受体(TGF  $\beta$  R) 丢失, 对某些肿瘤的肿瘤细胞生长具有重要的作用。据报道, 在乳腺癌细胞中, Sp3 是该通路的抑制剂, 并且在胰腺癌细胞中发挥相似的抑制 P21 的作用<sup>[9]</sup>。而 Sp3 具有抑制编码 FLIP 蛋白基因的启动子的作用。因此, Sp3 对 FLIP 信号通路的调节作用, 可能为肿瘤的治疗提供一种新方法的依据<sup>[10]</sup>。

转录因子 Sp 家族成员是自身调节基因, Sp1 和 Sp3 的结合位点位于邻近的启动子上<sup>[11,12]</sup>。有实验证明, 干扰 Sp3 和 Sp1 二者的其中之一, 另一种蛋白也会表达下调, 且多项研究表明, Sp3 和 Sp1 二者在功能方面具有重叠又有各自的特点<sup>[13]</sup>。Sp3 和 Sp1 在细胞凋亡, 细胞周期, 血管生长及肿瘤生长等方面具有相似, 或者相反的作用。早期的研究表明, Sp1 是转录激活物, 而 Sp3 是转录遏制物, 或者至多是个较弱的转录激活物。但是, 越来越多的证据显示, Sp3 和 Sp1 在基因表达方面具有双重的调节作用<sup>[14,15]</sup>。另有一些研究证明, Sp3

是 P21 启动子的反式作用子<sup>[16]</sup>。Sp3 是诱导型基因转录重要激活物<sup>[17]</sup>。染色质免疫共沉淀实验(CHIP)表明 Sp3 结合是干扰素依赖的启动子序列<sup>[18]</sup>。Higgins 等发现,在 E2-敏感的 ZR-75 细胞中,由于 Sp3 存在,雌激素受体  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )/Sp3 对血管内皮细胞生长因子的启动序列有重要的作用<sup>[15]</sup>。

综上所述, TFF2 抑制炎症反应,加快上皮细胞修复,促进细胞凋亡作用。本课题实验结果还证实 TFF2 在胃癌细胞中过表达,可加快胃癌细胞株 BGC-823 的凋亡,抑制肿瘤细胞增殖,以及将肿瘤细胞阻抑在 G1 期,并具有促进肿瘤细胞迁移和侵袭的作用。我们还检测凋亡和周期相关的信号通路蛋白水平,发现与 TFF2 相关的信号途径。

在实验中,我们还初步证实 Sp3 蛋白能与 TFF2 相结合。而目前,关于 Sp3 相关的研究主要在其基因调控功能方面,而对其蛋白水平及其在肿瘤细胞生物学功能方面的研究甚少。因此,本课题主要是在 Sp3 与 TFF2 两者结合关系的基础上,从蛋白水平去探索两者之间可能存在的相互作用,以及由此产生的细胞生物学效应。在 TFF2 的生物学效应研究的基础上,我们又进一步探讨了 Sp3 与 TFF2 之间的关系,发现在过表达 TFF2 并特异性干扰 Sp3 蛋白后,胃癌细胞相关的生物学效应发生相反的变化。通过相关信号通路蛋白水平的检测,我们也证实这些效应的生物学基础。根据实验结果,我们提出一个假设,Sp3 不仅是 TFF2 的一个可能结合蛋白,同时它也是 TFF2 产生生物学效应的一个不可或缺的蛋白。

本课题将证实 TFF2 的一个新结合蛋白 Sp3,并对二者结合的位点及分子机制进行深入研究,分析二者结合对细胞生物学效应所产生的影响,并进一步探讨它们对胃癌细胞发生发展的相互作用。前期的预实验结果,已证实二者对细胞生物学效应有明确的影响,并且我们从蛋白水平证实这些变化的基础。这些发现目前尚无报道,开展相关的研究具有很好的原创性。我们希望通过本课题的研究,能够在分子水平阐明 TFF2 与 Sp3 在胃癌细胞中的相互作用机制,探讨二者产生的生物学效应,阐明二者的信号途径基础,并期望能为胃癌的早期诊断和分子靶向治疗提供相应细胞分子生物学依据。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库